

Stepwise Mechanical Stretching Inhibits Chondrogenesis through Cell-Matrix Adhesion Mediated by Integrins in Embryonic Rat Limb Bud Mesenchymal Cells.

著者	小野寺 和之
号	27
学位授与番号	207
URL	http://hdl.handle.net/10097/36346

氏 名 (本籍)	おの でら かず ゆき 小野寺 和 之
学 位 の 種 類	博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号	歯 博 第 2 0 7 号
学位授与年月日	平 成 1 4 年 3 月 2 5 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 ・ 専 攻	東北大学大学院歯学研究科 (博士課程) 歯 学 臨 床 系
学 位 論 文 題 目	Stepwise Mechanical Stretching Inhibits Chondrogenesis through Cell-Matrix Adhe- sion Mediated by Integrins in Embryonic Rat Limb Bud Mesenchymal Cells. (機械的伸展 力はインテグリンによる細胞－細胞外基質間 の接着を介しラット四肢胚原器由来間葉系細 胞からの軟骨細胞分化を抑制する)

(主査)

論文審査委員

教授 三 谷 英 夫

教授 加賀山 学

教授 高 田 春比古

論文内容要旨

矯正歯科医療の分野では、成長期における機能異常あるいは機械的治療による力学的な外的環境の変化が、成長中の顎口腔機能複合体、すなわち、歯列・口腔・顎関節などの成長終了後の形態と機能の調和に影響を与える因子として長年にわたって研究の対象となってきた。

組織細胞化学的研究や細胞生物学的研究は、生理的範囲の圧縮力の負荷に伴い軟骨細胞における細胞外基質の合成が促進されることや、未分化な間葉系細胞の軟骨細胞への分化が促進されること、また、これらとは反対に、牽引力の負荷は軟骨組織の分化を阻害し、軟骨細胞を線維芽細胞へと脱分化させる可能性が示されている。

本研究では、ラットを用いた動物実験で示された正中口蓋縫合軟骨に対する牽引力の負荷に伴う軟骨細胞の線維芽細胞様細胞への形態変化と $\alpha 5 \beta 1$ インテグリン分子の発現の関係を解明することを目的とする。

実験材料として胎齢12日 SD 系ラット胎仔の四肢の長管骨原基より細胞を採取した。培養は、10%ウシ胎児血清添加の DMEM を用い、コラーゲンコートシリコン膜上で高密度平面培養を行った。期間は、3日間の培養で細胞を定着させた後、1～3日間伸展力を負荷した。初期の負荷は1.5mmで1日0.5mmずつ負荷を加えた。

細胞-細胞外基質間接着阻害実験として、インテグリンと細胞外基質の接着を特異的に阻害するペプチドを添加した。また、細胞の分化段階を調べるため、mRNAの定量を半定量的 RT-PCR 法により行った。

細胞の分化指標として、I型、II型コラーゲン、アグリカンおよびファイブロネクチンを用いた。

細胞レベルで形態観察を行い、染色方法として、Alcian blue 染色および免疫組織化学染色を用いた。

Alcian blue 染色からはコントロールに比べ実験群では chondroogenic nodule が小さく、数も少ないことが観察された。免疫染色においては、ストレスファイバーの形成が実験群で見られたが、コントロール群では見られなかった。

実験群のII型コラーゲンの遺伝子発現量はコントロール群に比べて20～30%統計学的に有意に抑制されており、同様に、アグリカンの遺伝子発現量はコントロール群に比べて1および2日で統計学的に有意に抑制されていた。また、用量依存的にII型コラーゲンの遺伝子発現量は抑制されていた。機械的伸展力によってI型コラーゲンおよびファイブロネクチンの遺伝子発現は影響を受けなかった。RGD 配列を含むペプチドにより細胞-細胞外基質の接着が阻害された群では軟骨形成は機械的伸展力によって阻害されなかった。

以上のことから、機械的伸展力はインテグリンを介してラット四肢骨原器由来間葉系細胞の軟骨細胞への分化を抑制し、生力学的な刺激からのシグナル伝達は細胞-細胞外基質間の接着によって仲介されていることが示唆された。

審 査 結 果 要 旨

顎・顔面の発生およびそれに続く成長は複雑な遺伝子と環境の相互作用によって制御されており、中でも機械的ストレスは骨格系細胞の分化・形成に影響を与える主要な因子として長年にわたって研究の対象となってきた。また、機械的ストレスが細胞内へのシグナルに変換されるメカニズムとして細胞－細胞外基質の接着が関与している可能性が示されている。これまでに行われてきた組織細胞化学的研究や細胞生物学的研究は、生理的範囲の圧縮力の負荷に伴い軟骨細胞における細胞外基質の合成が促進されることや、未分化な間葉系細胞の軟骨細胞への分化が促進されること、また、これらとは反対に、牽引力の負荷は軟骨組織の分化を阻害し、軟骨細胞を線維芽細胞へと脱分化させることを示唆してきた。

本研究では、ラットを用いた動物実験で示された正中口蓋縫合軟骨に対する牽引力の負荷に伴う軟骨細胞の線維芽細胞様細胞への形態変化と $\alpha 5 \beta 1$ インテグリン分子の発現の関係を解明することを目的とする。

方法として、SD 系ラット胎仔の四肢の長管骨原基より細胞を採取し、シリコン膜上で高密度平面培養を3日間行った後、1～3日間伸展力を負荷した。同時に、細胞－細胞外基質間接着阻害実験として、インテグリンと細胞外基質の接着を特異的に阻害するペプチドを添加した。細胞の分化段階を調べるため、メッセンジャー RNA の定量を半定量的 RT-PCR 法により行い、分化指標として、I 型、II 型コラーゲン、アグリカンおよびファイブロネクチンを用いた。形態観察を行うための染色方法として、アルシアンブルー染色および免疫組織化学染色を用いた。

実験の結果、アルシアンブルー染色からはコントロールに比べ実験群では chondrogenic nodule が小さく、数も少ないことが観察された。免疫染色においては、ストレスファイバーの形成が実験群で見られたが、コントロール群では見られなかった。実験群の II 型コラーゲンの遺伝子発現量はコントロール群に比べて 20～30% 統計学的に有意に抑制されており、同様に、アグリカンの遺伝子発現量はコントロール群に比べて 1 および 2 日で統計学的に有意に抑制されていた。また、用量依存的に II 型コラーゲンの遺伝子発現量は抑制されていた。RGD 配列を含むペプチドにより細胞－細胞外基質の接着が阻害された群では軟骨形成は機械的伸展力によって阻害されなかった。

これらの結果から、機械的伸展力はインテグリンを介してラット四肢骨原器由来間葉系細胞の軟骨細胞への分化を抑制し、生力学的な刺激からのシグナル伝達は細胞－細胞外基質間の接着によって仲介されていることが示唆された。

本研究は、軟骨細胞の初期分化過程における機械的ストレスの影響に関して新たな知見を与え、今後の基礎ならびに臨床研究の発展に寄与するところが多い。よって、本論文は歯学博士の学位授与に値するものと判定する。